

PRODUCTION OF HYDROLYZED PROTEIN

Publication number: JP7115969

Publication date: 1995-05-09

Inventor: FUJII MIKIO; NAGAOKA YOSHIKO

Applicant: ASAHI CHEMICAL IND

Classification:

- International: A23J3/06; A23J3/34; A23L1/227; C12N9/52;
C12R1/38; C12R1/465; A23J3/00; A23L1/226;
C12N9/52; A23L1/226; (IPC1-7): A23J3/06; A23L1/227;
C12N9/52; A23J3/34; C12N9/52; C12R1/38; C12N9/52;
C12R1/465

- european:

Application number: JP19930266467 19931025

Priority number(s): JP19930266467 19931025

[Report a data error here](#)

Abstract of JP7115969

PURPOSE: To obtain an enzymic agent, containing prolyl endopeptidase, prolidase and prolinase derived from the same microorganism and useful for providing a hydrolyzed protein useful as a quality improver, etc., for a seasoning or a food. CONSTITUTION: This enzymic agent contains prolyl endopeptidase, prolidase or prolinase derived from the same microorganism (e.g. a bacterium of the genus *Pseudomonas* or *Streptomyces*). Thereby, plural enzymes are stably present and peptide bond in which a hardly hydrolyzable proline residue participates is readily hydrolyzed to improve the hydrolytic ratio of proteins. The treatment with an enzyme having exopeptidase activities is combined therewith to further improve the hydrolytic ratio.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-115969

(43)公開日 平成7年(1995)5月9日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 N 9/52
A 2 3 J 3/34
// A 2 3 J 3/06
A 2 3 L 1/227
(C 1 2 N 9/52

識別記号 庁内整理番号
9152-4B

F I

技術表示箇所

B
審査請求 未請求 請求項の数5 O.L (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-268467

(22)出願日 平成5年(1993)10月25日

(71)出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 藤井 幹夫

静岡県富士市駿島2番地の1 旭化成工業
株式会社内

(72)発明者 長岡 由子

静岡県富士市駿島2番地の1 旭化成工業
株式会社内

(54)【発明の名称】 加水分解蛋白質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 呈味力が増強され、味質の良い加水分解蛋白質を製造するための酵素剤ならびに製造法を提供する。

【構成】 同一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリグレーゼおよびプロリナーゼを含有することを特徴とする酵素剤および該酵素剤を用いた蛋白質の加水分解法。

【効果】 蛋白質が高度に加水分解され、呈味力が増強される。また、最終産物中のアスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、プロリン、グリシン等呈味性の高いアミノ酸の遊離率が高まり、味質の良い加水分解蛋白質が製造できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 同一微生物由来のプロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含有することを特徴とする酵素剤。

【請求項2】 微生物が*Pseudomonas*属細菌である請求項1記載の酵素剤。

【請求項3】 微生物が*Streptomyces*属細菌である請求項1記載の酵素剤。

【請求項4】 食品蛋白質、食品蛋白質の部分消化物、および食品蛋白質由來のペプチドを、請求項1乃至請求項3記載の酵素剤で消化することを特徴とする加水分解蛋白質の製造方法。

【請求項5】 エキソペチダーゼ活性を有する酵素による消化を組み合わせることを特徴とする請求項4記載の加水分解蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、加水分解蛋白質の製造方法に関する。加水分解蛋白質は調味料、食品の品質改良剤等に幅広く利用されている。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質の加水分解は從来酸鉄を添加して高酸、高圧処理する事により行われている。特に食品用途では、製品に苦味を生じさせないために塩酸が用いられている。しかししながら、蛋白質を塩酸で加水分解した場合には蛋白質中に微量に残存している油脂類と塩酸とが反応する事によりモノクロロプロパンジオール(MCP)やジクロロプロパノール(DCP)等の好ましくない塩素化化合物が生成することが近年問題になりつつある。一方、蛋白質分解酵素を用いた蛋白質の加水分解も多く報告されているが、高価な酵素を多量に必要とする事から、反応中に酵素汚染を生じる可能性が高いこと、さらに蛋白質を高度に加水分解することが困難であることから、実用化されている例は少ない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、複数の酵素が安定に存在しうる酵素剤を提供することにより、該酵素剤を用いて蛋白質を高度に加水分解する方法を開発することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 酵素による加水分解で蛋白質の加水分解率が低い原因としては、蛋白質中に存在するプロリン残基がポイントと考えられる。すなわち、プロリンは環状α-アミノ酸であり、他のアミノ酸とは異なる立体構造をしている。蛋白質またはペプチド中のプロリン残基のイソノ基やカルボキシル基が開くるペプチド結合は通常の蛋白質分解酵素による加水分解を受けにくくことが理由として考えられる。本発明者は上記の課題を解決すべく観察検討した結果、同一微生物由來のプロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよび

プロリナーゼを含有する酵素剤による処理、あるいは当該酵素剤処理とエキソペチダーゼ活性を有する酵素による処理とを組み合わせることにより、從来加水分解され難かったプロリン残基が開くペプチド結合が効率よく加水分解され、その結果、蛋白質の加水分解率を高めることができることを見出し、本発明を完成させたに至った。プロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼは、ほ乳類の臍器に広く分布しているが、臍器の入手が困難であるため、入手容易な微生物由來の酵素剤を用いることを望ましい。また、上記3種の酵素を別々の微生物から調製し、これらを混合することにより本発明と同様の操作を行うことも可能はあるが、由来の異なる蛋白質分解系酵素を混合した場合には、それぞれの酵素が互いに別の酵素蛋白質を加水分解する結果、酵素活性が急激に低下する恐れがある。これに対し、同一微生物由來の酵素の場合には、長期間の培養後でも安定に存在していたものであり、これらを同時に存在させて上記の様な活性低下の恐れはない。

【0005】 プロリエンドペチダーゼ(別名ポストプロリンクリーピング酵素またはプロリン特異的エンドペチダーゼ、EC 3.4.21.26)を生産する微生物としては、*Flavobacterium*属細菌、*Xanthomonas*属細菌、*Alcaligenes*属細菌、*Streptomyces*属の放線菌が報告されている。通常のプロリエンドペチダーゼは低分子ペプチドには作用するものの高分子ペプチドや蛋白質には作用しないが、*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株が生産するプロリエンドペチダーゼはカゼイン等の高分子基質を加水分解することが報告されている。これら微生物以外にもプロリエンドペチダーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリエンドペチダーゼを取得することも可能である。プロリエンドペチダーゼを生産する微生物は、その培養液をカルボペンゾキシラニルアラニル-ラニル-プロリル-バラニトロアニド(以下Z-Ala-Ala-Pro-pNAと略す)に作用させ、黄色のバラニトロアニドを避離せさせることを指標に土壠等により分離することができる。

【0006】 プロリダーゼ(別名プロリンジペチダーゼ、EC 3.4.13.9)を生産する微生物としては、*Escherichia coli*、*Lactococcus lactis*、*Streptococcus cremoris*、*Neurospora*属真菌、*Thermus aquaticus*、*Pseudomonas*属細菌等が報告されている。プロリダーゼはX-Proの構造のジペプチドを加水分解するが、X-Pro-Yの構造のトリペプチドのX-Pro結合を加水分解する場合もある。これら微生物以外にもプロリダーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングするこ

3

とにより新規プロリダーゼを取得することも可能である。プロリダーゼを生産する微生物は、その培養液をグリシループロリン（以下Gly-Prolと略す）に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壠等より分離することができる。

【0007】プロリナーゼ（別名プロリジペチダーゼ、EC 3.4.13.8）を生産する微生物としては、*Streptococcus cremoris*、*Streptococcus thermophilus* 等が報告されている。プロリナーゼはPro-Xの構造のジペチドを加水分解する酵素であり、これら微生物以外にもプロリナーゼを生産する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリナーゼを取得することも可能である。プロリナーゼを生産する微生物は、その培養液をプロリペギシン（以下Pro-Glyと略す）に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壠等より分離することができる。

【0008】プロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを同時に生産する微生物として、*Pseudomonas* sp. KU-22株および*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株があげられる。*Pseudomonas* sp. KU-22株は好気性の桿菌であり、YM培地（ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.3%、マルトエキス0.3%、グルコース1.0%、寒天1.0%、pH7.2）上30°Cで培養した場合に淡黄土色、表面で光沢のあるコロニーを形成する。細胞のサイズは0.4μm×1.6μmの直桿菌であり、グラム染色陰性、運動性あり、極性鞭毛、ウレアーゼテスト陽性、カタラーゼテスト陽性、オキシダーゼテスト陽性、クエン酸利尿テスト陽性、澱粉加水分解テスト陰性、グルコース酸化能（OF-テスト）陽性、キノン系はQ-9、黄色色素產生なし、水溶性色素產生なし、紫紅色素產生なし、アルギニン加水分解酵素テスト陰性、フォグース-プロスカウエルテスト（VP-テスト）陰性、硝酸還元テスト陰性、メチルレッドテスト陰性、D-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、エタノール、スクロースより好気条件下に酸を生成しない、37°C、40°C、42°Cで生育し、45°Cで生育しない、5%食塩存在下に生育し、10%食塩存在下に生育しない、好気条件下にD-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、酢酸を資化し、スクロースを資化しない。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13788として寄託されている。

【0009】*Pseudomonas* sp. KU-22の培養液より酵素剤を得る方法は公知の方法をそのまま、または一部修正して用いることができる。これらペチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、脱脂大豆、食塩を含有する培地が有効である。培養温度30°Cで2日間程度の培養により著量のプロリエンド

ペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。酵素の収量を増大させるために、超音波による菌体破砕または浸透圧ショック等を行うこと也有効である。菌体または菌体残渣を除去した後、たとえば疏安分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル滌過クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、蛋白質の加水分解を行う場合には培養液や菌体破砕液をそのまま、または粗精製程度で充分である。

【0010】*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株はスターーチ・無機塩寒天培地で30°Cで培養することにより、よく分枝した基質糸からstraight-tflexurusの気胞糸を伸長し、成熟した気胞糸の先に10~50個の梢円~円筒形の胞子からなる胞子嚢を形成する。胞子嚢は無く、胞子の大きさは0.7~1.0×1.0~1.5μmで、胞子表面はsmoothであり、鞭毛は認められない。本菌株の細胞壁の糖成分には特に特徴は認められず、細胞壁成分のジアミノビペリノ酸はLL型である。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13827として寄託されている。

【0011】*Streptomyces xanthophaeus* HA-36株の培養液より酵素剤を得る方法は、公知の方法をそのまま、または一部修正して用いることができる。ペチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、澱粉、乾燥酵母、食塩を含有する培地が有効である。培養温度30°Cで4日間程度培養することにより著量のプロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。菌体および不溶性成分を除去した後、たとえば疏安分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル滌過クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、蛋白質の加水分解を行う場合には培養液をそのまま、または粗精製程度で充分である。尚、既知のプロリエンドペチダーゼは通常高分子の基質に対しては全く作用しないが、本微生物が生産するプロリエンドペチダーゼは高分子基質であるカゼインに対しても加水分解活性を示すことが特徴である。

【0012】蛋白質を加水分解する場合には、まず対象となる蛋白質を通常の蛋白質加水分解酵素で低分子化しておくことが望ましい。用いる酵素としてはエンド型活性の高いものが適している。市販の酵素としてはノボ社のアルカラーゼやニュートラーゼ、天野製薬のプロテアーゼN等が利用できる。エンド型酵素による消化が終了した後に残存する酵素はプロリエンドペチダーゼの安定性に悪影響を及ぼす場合があるため、限外濾過等による除去または加熱失活等を行っておくことが望ましい。

【0013】あらかじめエンド型酵素で処理した蛋白質

をプロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびブロリナーゼを含む酵素剤で処理する場合には、同一微生物の培養物や細胞破碎液をそのまま使用するか、またはこれらより酵素を粗精製したものを用いることができる。反応は通常の酵素反応と同じく酵素が失活しない程度の一一定の濃度で攪拌条件で行うことが望ましい。

【0014】加水分解の最終段階として、エキソ型酵素による加水分解に先立ち、プロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびブロリナーゼの除去または失活処理を行うことは必ずしも必要ではない。反応後のpHを適宜調整した後、エキソ型活性の高い酵素を添加して反応を行う。用いる酵素としては天野製薬のプロテアーゼM、プロテアーゼA、科研製薬のアクリナーゼ等の酵素が利用可能であるが、*Aspergillus*属、*Rhizopus*属、*Streptomyces*属等の培養液等を酵素剤のわりに用いることも可能である。酵素反応が終了した後、脱色、濃縮、殺菌等の処理を行い、目的の加水分解蛋白質が調製される。

【0015】本発明により得られる加水分解蛋白質は、プロリエンドペチダーゼ、プロリダーゼおよびブロリナーゼを含む酵素剤による加水分解工程を行わない場合に比較してその加水分解率(アミノ酸の遊離率)が上昇しており、中でもグルタミン酸、グリシン、プロリン等の呈味性の高いアミノ酸の遊離率が特に上昇するため、食品用途、特に調味料としての利用価値がより高まることが特徴である。

【0016】以下に本発明の実施例を示すが、本発明がこれらに限定されるものではない。

【0017】

【実施例】

【0018】

【実施例1】

1) KU-22粗酵素液の調製

Pseudomonas sp. KU-22株を2%グルコース、2%脱脂大豆、0、3%食塩よりなる培地100ml(pH7.2)を500ml1容器口フラスコ6本に移植し、30℃で4時間振盪培養を行った。培養液より遠心分離により(8,000×g、20分)菌体を集め、20mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で2回洗浄後、菌体を超音波処理することにより粉砕した。その後遠心分離(8,000×g、20分)により細胞残渣を除去することにより無細胞抽出液233mlを得た。この無細胞抽出液を氷中に冷却攪拌しながら90%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間氷水中で攪拌させた後4℃で一夜放置した。沈澱物をセライト過濾により回収し、氷冷した20mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)(以下緩衝液Aと称する)に溶解し、遠心分離(8,000×g、20分)によりセライトを除去した。統いて緩衝液Aに対して透析を行

い、粗酵素液を得た。(以下KU-22粗酵素液と称する)。

【0019】プロリエンドペチダーゼ活性の測定は以下の条件にて行った。即ち、1mM Z-Ala-Ala-Pro-pNA(40%メタノールに溶解)20μlに50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)800μlを加え、37℃で5分間予備保温した後、酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの)200μlを添加して30分間反応させた。1Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.5)を400μl加えて反応を停止させた。基質に1M酢酸緩衝液(pH3.5)をあらかじめ加えた後で酵素サンプルを添加したものをブランクとして410nmの吸光を測定し、反応により遊離したパラニトリアニリンの量を求めた。尚、プロリエンドペチダーゼ1単位は1分間に1μmolのパラニトリアニリン相当量を遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリエンドペチダーゼの活性は0.14単位/mlであった。

【0020】プロリダーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Gly-Proを含む緩衝液Aに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの)10μlを加え、37℃で30分間反応させた。これに和光純薬製ニンヒドリン液(アミノ酸自動分析装置用)40μlを加え、70℃で20分間加熱した後、蒸留水で10倍に希釈した。同時に、Gly-Pro溶液にニンヒドリン液を添加し、引き続き酵素サンプルを添加してニンヒドリン反応させ、蒸留水で10倍に希釈したものをブランクとした。それぞれの350nmの吸光度を測定することにより、酵素反応により生じた350nmの吸光度の増加を求めた。一方、5mMのGly-Pro溶液と、5mMグリシンおよび5mMプロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液200μlに蒸留水10μlを加え、上記と同様にニンヒドリン反応と蒸留水による希釈を行ったものを各種準備し、これらの350nmの吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線よりプロリンの濃度を求め、プロリダーゼにより生じたプロリン量を算出した。尚、プロリダーゼ1単位は1分間に1μmolのプロリンを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリダーゼ活性は0.64単位/mlであった。

【0021】ブロリナーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Pro-Glyを含む緩衝液Aに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの)10μlを加え、37℃で30分間反応させた。これに和光純薬製ニンヒドリン液(アミノ酸自動分析装置用)40μlを加え、70℃で20分間加熱した後、蒸留水で10倍に希釈した。同時に、Pro-Gly溶液にニンヒドリン液を添加し、引き続き酵素サンプルを添加してニンヒドリン反応させ、蒸留水で10倍に希釈したものをブランクとした。それぞれの350nmの吸光度を測定する

ことにより、酵素反応により生じた 350 nm の吸光度の増加を求めた。一方、5 mM の Pro-Gly 溶液と、5 mM グリシンおよび 5 mM プロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液 200 μl に蒸留水 10 μl を加え、上記と同様にヒドロゲン反応と蒸留水による希釈を行ったものを各種準備し、これらの 350 nm の吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線より遊離プロリンの濃度を求め、プロリダーゼにより生じたプロリン量を算出した。尚、プロリナーゼ 1 単位は 1 分間に 1 μmol のプロリンを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22 粗酵素液のプロリナーゼ活性は 1.3 単位/ml であった。

2) HA-36 粗酵素液の調製

Streptomyces xanthophaeus

HA-36 株を 1% グルコース、1% 可溶性澱粉、2% 乾燥酵母、0.3% 食塩よりなる培地 100 ml (pH 7.2) を含む 50 ml 容器口フラスコ 2 本に移植し、30°C で 4 日間振盪培養を行った。培養液を遠心分離 (8,000 × g、20 分) することにより菌体を除き、この液を水中で冷却攪拌しながら 80% 饱和となるように硫酸アミニウムを加え、30 分間水中で攪拌させた後 4°C で一夜放置した。沈殿物を遠心分離 (8,000 × g、20 分) により回収し、氷冷した緩衝液 A に溶解させた。続いて緩衝液 A に対して透析を行い、粗酵素液を得た。(以下 HA-36 粗酵素液と称する)。プロリエンドペチダーゼ活性は 0.073 単位/ml、プロリナーゼ活性は 0.070 単位/ml であった。

3) 蛋白質の調製とアルカラーゼ処理

5 リットル容高圧オートクレープに豚脳 3,600 g と水 7,200 g を仕込み、密封後に昇温を開始した。オートク

レーブ内の内圧が 0.5 kg/cm² に達したらオートクレープ内のエア抜きを実施し、再度密封してオートクレープの内圧が 5 kg/cm² になるまで加熱し、1 時間煮出しを行った。冷却後、オートクレープ内の液を 5 リットル容分液ロートに移し、上層の油を除いて下層の豚骨抽出液 2400 g を回収し、これをエバボレーターで濃縮して T-N 7.7%、F-N 0.39% の濃縮液 450 g を得た。本濃縮液 210 g に水を 780 g を加えて希釈後、1.6% 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 8.0 に調製した。この溶液にアルカラーゼ 0.6 L (ノボ社製) を 4 g 添加し、55°C で 6 時間反応させた。反応中の pH は 1.6% 水酸化ナトリウム溶液で常時 8.0 となるように調整した。反応終了液を分画分子量 6000 の限界過濾 (旭化成社製 S I P-1013) で滤過して酵素を除去した。本アルカラーゼ処理液は T-N = 1.63%、F-N = 0.204% であり、加水分解率は 12.5% と算出された。

4) 粗酵素液およびプロテアーゼ M による加水分解

3 本の試験管 A、B、C (上記 3) で得られたアルカラーゼ処理液をそれぞれ 1.5 ml ずつ分注した。試験管 A には上記 1) で得られた KU-22 粗酵素液 1.5 ml を、試験管 B には上記 2) で得られた HA-36 粗酵素液 1.5 ml を、また試験管 C には蒸留水 1.5 ml を添加して 37°C で 24 時間反応させた。反応終了後、pH をそれぞれ 5.0 に調整し、天野製薬プロテアーゼ M をそれぞれ 0.2 gずつ添加し、50°C で 24 時間反応させた。反応終了液をそれぞれサンプル A、B、C と称し、ケルダール窒素 (T-N) およびホルモール窒素 (F-N) の分析を行った。表 1 に結果を示した通り、サンプル A および B ではコントロールであるサンプル C に比べて加水分解率が約 10% 高くなっていた。

【表 1】

プロリエンドペチダーゼによる蛋白質の加水分解

サンプル	T-N (%)	F-N (%)	分解率 (%)
A	1.50	0.463	30.9
B	1.48	0.436	29.5
C	1.51	0.343	22.7

【0023】

【実施例 2】

1) KU-22 粗酵素液の調製

Pseudomonas sp. KU-22 株を 2% グルコース、2% 乾燥大豆、0.3% 食塩よりなる培地 500 ml (pH 7.2) を含む 5 リットル容フラスコ 2 本に移植し、30°C で 48 時間振盪培養を行った。培養

液より遠心分離により (8,000 × g、20 分) 菌体を集め、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で 3 回洗浄後、50 mM トリス-塩酸 + 1 mM EDTA (pH 8.0) + 0.5 M スクロースの緩衝液中に懸滴した。30°C で 30 分間保温した後菌体を集め (8,000 × g、20 分)、これに 50 mM トリス-塩酸 + 1 mM EDTA の緩衝液を加えて懸滴し、3

9

0°Cで30分間保温することにより浸透圧ショックを施した。遠心分離(10,000×g、20分)により菌体を除去し、上澄液を凍結成形製限外滲過モジュールA I P-0013で滲過することにより酵素を濃縮し、1 mMの塩化マンガンを含む緩衝液Aに対して透析を行った結果、プロリエンドペプチダーゼ活性が0.38単位/m1、プロリダーゼ活性が1.7単位/m1、プロリナーゼ活性が3.2単位/m1の酵素液約40m1を得た。

2) 蛋白質の調製とアルカラーゼ処理

前記実施例3の3)と同様の方法を用いて豚骨からの蛋白質の調製とアルカラーゼ処理を行い、T-N=1.6%、F-N=0.14%のアルカラーゼ処理液を得た。

3) 粗酵素液およびプロテアーゼMによる加水分解
500m1容三角フラスコに上記2)で得られたアルカ*

プロリエンドペプチダーゼによる蛋白質の加水分解

*ラーゼ処理液200m1(上記1)で得られた粗酵素液30m1を加え、マグネットミキサーで攪拌しながら37°Cで24時間反応させた。反応終了後、塩酸を加えてpHを5.0に調製し、凍結成形製限外滲過モジュールA I P-0013で滲過することにより酵素を除去した。この液に天野製薬のプロテアーゼMを5g添加し、スターラーで攪拌しながら50°Cで30時間反応させた(サンプルD)。一方、粗酵素液の代わりに蒸留水を添加する以外全く同様に処理したもの(コントロールサンプル(サンプルE))とした。サンプルD、EにつきT-NとF-Nの測定を行った結果(表2)サンプルEの分解率が26%であったのに対しサンプルDでは40%と高くなっていた。

【0024】

【表2】

サンプル	T-N (%)	F-N (%)	分解率 (%)
D	1.40	0.56	40
E	1.41	0.40	26

【0025】サンプルDおよびEにつき、アミノ酸分析を行った。全アミノ酸を測定する場合にはサンプルを6Nの塩酸存在下、120°Cで18時間加水分解した後、遊離アミノ酸を測定する場合にはそのまま、日本電子社製JLC-300アミノ酸分析装置にて分析した。その結果を表7に示したが、サンプルDはサンプルEに比べ

てアスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、プロリン、グリシン等の呈味性アミノ酸の遊離率が大幅に高まっており、苦みを呈する疎水性アミノ酸の遊離率はあまり増加していないことが確認された。

【0026】

【表3】

遊離アミノ酸の変化

アミノ酸	サンプルD	サンプルE
A s p	1. 54	0. 70
S er	3. 03	1. 20
T hr	2. 15	1. 13
G lu	2. 56	1. 35
P ro	3. 07	1. 53
G ly	6. 11	2. 19
A la	6. 75	4. 46
C ys	0. 37	0. 33
V al	2. 88	1. 94
M et	0. 72	0. 83
I le	1. 60	1. 06
L eu	3. 27	2. 45
T yr	1. 83	0. 94
P he	1. 54	1. 09
H is	1. 09	1. 12
L ys	1. 66	1. 02
A rg	2. 20	1. 81

サンプル中の全アミノ酸のモル数の合計に対する各遊離アミノ酸のモル数の比(%)で表示。

【0027】

【発明の効果】蛋白質の加水分解にプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含む酵素剤による処理とエキソペプチダーゼによる処理とを組み

合わせることにより加水分解率が向上し、さらに呈味性

に優れたアミノ酸の遊離率が向上することから、食品、特に調味料用途の蛋白質の加水分解に効果的に利用でき

る。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.5
C 12 R 1:38)
(C 12 N 9/52
C 12 R 1:465)

識別記号 序内整理番号 F 1

技術表示箇所